

PCT



ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/52, 15/82	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/10074 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. März 1998 (12.03.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04812 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. September 1997 (04.09.97) (30) Prioritätsdaten: 196 35 917.1 4. September 1996 (04.09.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). SCHMIDT, Ralf- Michael [DE/DE]; Gräfensteinstrasse 14, D-67434 Neustadt (DE). SCHIFFER, Helmut [DE/DE]; Theodor-Heuss- Strasse 31, D-67112 Mutterstadt (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Martha-Brauttsch-Strasse 7a, D-06467 Hoym (DE). BADUR, Ralf [DE/DE]; Blechenstedter Strasse 7, D-31137 Hildesheim (DE). (74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, Postfach 86 06 49, D-81633 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE (54) Bezeichnung: ADENYLOSUCCINAT SYNTHETASE (57) Abstract Expression cartridges are disclosed which confer to plants, plant cells, tissues or parts a resistance against inhibitors of the vegetable adenylosuccinate synthetases. Also disclosed is the use of the expression cartridges in appropriate vectors to transform plants, plant cells, tissues or parts. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft Expressionskassetten, die in Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetasen vermitteln sowie die Verwendung der Expressionskassetten in geeigneten Vektoren zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Adenylosuccinat Synthetase

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Expressionskassetten, kodierend für nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Synthetasen (ADSS), die Pflanzen Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher ADSS vermitteln; Vektoren und Mikroorganismen, enthaltend solche
- 10 Expressionskassetten; damit transformierte transgene Pflanzen; die entsprechenden Expressionsprodukte und Nukleinsäuresequenzen; sowie einen Expressions-Kit zur Verwendung bei der Transformation eines pflanzlichen Wirts.
- 15 Pflanzen sind als photoautotrophe Organismen in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren. Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Insbesondere müssen Pflanzen auch die Nukleotide als
- 20 Bestandteile der Nukleinsäuren de novo synthetisieren.

- Es ist anzunehmen, daß die effiziente Bildung, Nutzung und Verteilung der Nukleotide die Zellteilung und das Wachstum einer Pflanze stark beeinflussen. Da Pflanzen auf eine funktionierende
- 25 de novo Nukleotidbiosynthese angewiesen sind, bietet sich dieser Biosyntheseweg als Ziel für den Einsatz von Herbiziden an. Die komplexen Reaktionen, die die Nukleotidbiosynthese gewährleisten, unterteilen sich in Purin- und Pyrimidinbiosynthese.
- 30 Die Enzymreaktionen der Purinbiosynthese können ausgehend vom Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) in folgende Schritte unterteilt werden:
- a) Synthese des Pyrimidinringes
 - 35 b) Synthese des Purinringes
 - c) Verzweigung vom IMP zum AMP bzw. GMP

Die Reaktionssequenz von Schritt c) ist in beiliegender Figur 1 schematisch dargestellt.

- 40 Einige der an der Purinbiosynthese beteiligten Enzyme stellen potentielle Angriffspunkte für herbizide Wirkstoffe dar. Eine besondere Stellung nimmt die ADSS ein. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:
- 45
$$\text{IMP} + \text{L-Aspartat} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{Adenylosuccinat} + \text{GDP} + \text{Pi}$$

Die ADSS wurde aus *E. coli* zur Homogenität aufgereinigt (Bass et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys., 256, 335-342), die Kristallstruktur wurde bestimmt (Poland et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 25334-25342) und kinetische Eigenschaften des Enzyms wurden
5 charakterisiert (Kang und Fromm, 1995, J. Biol. Chem., 270, 15539-15544). Das Enzym wurde zudem aus *Dictyostelium discoideum* (Jahngen und Rossomando, 1984, Arch. Biochem. Biophys., 229, 145-154) und Kaninchenmuskel (J. Biol. Chem., 1974, 249(2), 459-464) aufgereinigt. Pflanzliche Adenylosuccinat Synthetase
10 wurde aus Weizenkeimlingen (Hatch, 1967, Phytochemistry, 6, 115-119) sowie aus Mais (Siehl et al., 1996, Plant Physiol., 110, 753-758) für eine Bestimmung der Enzymaktivität isoliert.

Die Adenylosuccinat Synthetase liegt in *E. coli* als Dimer zweier
15 48 kD Polypeptide vor. Für die pflanzliche ADSS liegen bisher keine Daten vor.

Gene, die für ADSS kodieren, wurden bisher aus *Escherichia coli* (EMBL-Accessions-Nummer J04199), *Bacillus subtilis* (J02732),
20 *Haemophilus influenzae* (L46263), *Saccharomyces pombe* (L22185), *Schizosaccharomyces pombe* (M98805), *Dictyostelium discoideum* (M58471), *Homo sapiens* (X65503) und *Mus musculus* (M74495) isoliert. Durch Datenvergleiche lassen sich "expressed-sequence-tags", sogenannte est-Sequenzen, aus *Arabidopsis thaliana*
25 (T42641) und *Oryza sativa* (D15352) mit deutlicher Ähnlichkeit zu den genannten ADSS finden.

Vollständige cDNA-Sequenzen pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetasen sind zudem aus *Arabidopsis thaliana* und Mais (US-A-5519125)
30 sowie aus Weizen beschrieben worden (WO96/19576).

Zur ADSS-Aktivitätsmessung sind keine Cofaktoren notwendig. Jedoch wurden die Wirkstoffe Hadacidin und Alanosin (Stayton et al., 1983, Curr. Top. Cell. Regul., 22, 103-141) sowie Hydantocidin bzw. dessen Metabolit 5'-Phosphohydantocidin beschrieben
35 (Siehl et al., 1996, Plant Physiol., 110, 753-758), die die Enzymaktivität der pflanzlichen ADSS hemmen.

Der phytotoxische Wirkstoff Hydantocidin wurde aus *Streptomyces hygroscopicus* (Stamm SANK 63584) isoliert (Nakajima et al., 1991, J. Antibiot., 44, 293-300). Es wurde gezeigt, daß das 5'-Phosphohydantocidin als in der Pflanze entstehender Metabolit der eigentliche Inhibitor der ADSS ist (Siehl et al., 1996, Plant Physiol., 110, 753-758). Hydantocidin entfaltet seine toxische Wirkung
45 nur bei Pflanzen, hat eine geringe Säugertoxizität und wirkt nicht auf verschiedene untersuchte Mikroorganismen (Nakajima et al., 1991, J. Antibiot., 44, 293-300). Es wäre wünschenswert,

wenn Wege gefunden werden könnten, das Ansprechen von Pflanzen auf ADSS-Inhibitoren gezielt zu verändern.

Der Erfindung liegt folglich die Aufgabe zugrunde, Mittel bereit-
5 zustellen, mit deren Hilfe gezielt das Ansprechen von Pflanzen auf ADSS-Inhibitoren modifiziert werden kann. Insbesondere sollte diese Modifikation auf gentechnischem Wege durchführbar sein.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung einer Expressions-
10 kassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein Protein, welches einem pflanzlichen Wirt Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetase vermittelt.

15 Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

- Figur 1 die de novo Purinbiosynthese in Pflanzen;
- Figur 2 die Nukleinsäuresequenz der Adenylosuccinat Syn-
20 thetase aus *Escherichia coli*, einschließlich der 5'-
und 3'-terminalen BamHI-Schnittstellen;
- Figur 3 die Aminosäuresequenz der Adenylosuccinat Synthe-
tase aus *Escherichia coli*;
- Figur 4 Oligonukleotidsequenzen zur Isolierung der Nukleinsäu-
25 resequenz der Adenylosuccinat Synthetase aus *Escheri-
chia coli*;
- Figur 5 die Nukleinsäuresequenz des Transitpeptides der chloro-
plastidären Transketolase in drei Leserastern;
- Figur 6 den Aufbau der Expressionskassetten und Transforma-
30 tionsvektoren pTP09, pTP10 und pTP11;
- Figur 7 den Aufbau der Expressionskassetten und des Trans-
formationsvektors pTP09-ASS.

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Expres-
35 sionskassetten, welche zur Transformation eines pflanzlichen Wirts geeignet sind und eine kodierende Sequenz enthalten, die dem Wirt Resistenz gegen Inhibitoren pflanzlicher ADSS verleihen.

Resistenz bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die
40 künstlich erworbene Widerstandsfähigkeit gegen die Wirkung pflanzlicher ADSS-Inhibitoren. Sie umfaßt die partielle und, insbesondere, die vollständige Unempfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

45 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Expressionskassetten für einen pflanzlichen Wirt, ausgewählt unter ganzen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzen-

- teilen, wie z.B. Blättern, Wurzeln, Früchten, bereitgestellt. Insbesondere ist der pflanzliche Wirt ausgewählt unter Kulturpflanzen, davon abgeleiteten Zellen, Geweben, oder Teilen. Als nicht-limitierende Beispiele für geeignete Kulturpflanzen können
- 5 genannt werden: Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Wein-species.
- 10 Insbesondere bei Kulturpflanzen bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, daß nach Induktion einer selektiven Resistenz der Kulturpflanze gegenüber pflanzlichen ADSS-Inhibitoren diese Inhibitoren als spezifische Herbizide gegen nichtresistente Pflanzen eingesetzt werden können. Als nicht-limitierende Beispiele für
- 15 derartige Inhibitoren können genannt werden Alanosin, Hadacidin, Hydantocidin sowie Metabolite und funktionell äquivalente Derivate davon. Funktionell äquivalente Derivate pflanzlicher ADSS-Inhibitoren besitzen ein vergleichbares Wirkungsspektrum wie die konkret genannten Substanzen, bei niedrigerer, gleicher oder
- 20 höherer inhibitorischer Aktivität (z.B. ausgedrückt in g Inhibitor pro Hektar Anbaufläche, erforderlich zur vollständigen Unterdrückung des Wachstums nicht-resistenter Pflanzen).

- Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Expressionskassetten,
- 25 deren kodierende Sequenz eine gegen pflanzliche ADSS-Inhibitoren tolerante, nicht-pflanzliche ADSS-Nukleinsäuresequenz oder ein funktionelles Äquivalent davon enthält. Die ADSS-Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.
- 30 Zur Insertion in eine erfindungsgemäße Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, welche im wesentlichen eine mikrobielle DNA-Sequenz umfassen, die für eine Adenylosuccinat Synthetase aus Mikroorganismen der Genera Escherichia, Bacillus, Haemophilus, Dictyostelium, Saccharomyces oder
- 35 Schizosaccharomyces und insbesondere aus Escherichia coli, Bacillus subtilis, Haemophilus influenzae, Dictyostelium discoideum, Saccharomyces pombe oder Schizosaccharomyces pombe kodiert. Insbesondere geeignet ist eine ADSS-Sequenz, die im wesentlichen der in Figur 2 (SEQ ID NO:1) dargestellten DNA-Sequenz aus E. coli
- 40 entspricht.

- Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Resistenz induzieren. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-
- 45 setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die Adenylosuccinat Synthetase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind für ADSS

5 kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer ADSS-Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Codon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Codon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch
5 Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Gegenstand der Erfindung sind auch die zu obigen Nukleinsäuresequenzen und zu den davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen funktionell äquivalenten Sequenzen. Funktionelle Äquivalente sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, die einander im wesentlichen entsprechen. Darunter versteht man insbesondere Sequenzvarianten, die durch natürliche oder künstliche Mutationen einer ADSS-Sequenz entstanden sind, sofern die gewünschte, zur Aufrechterhaltung des pflanzlichen Metabolismus notwendige, ADSS-Aktivität dabei erhalten bleibt. Die in den pflanzlichen Wirt transformierte exogene ADSS-Aktivität kann also höher, vergleichbar oder etwas geringer sein als diejenige der endogenen pflanzlichen ADSS. Mutationen umfassen Substitutionen, Deletionen, Vertauschungen
15 oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotid- oder Aminosäurereste.

Als Substitutionen werden Austausche von Nukleotiden oder Aminosäuren verstanden. Bevorzugt sind sogenannte stumme oder konservative Austausche. Ein stummer Nukleotidaustausch bewirkt keine Veränderung in der Aminosäuresequenz. Ein konservativer Austausch bewirkt eine Aminosäuresubstitution durch einen Aminosäurerest mit vergleichbaren Eigenschaften, wie z.B. Größe, Ladung, Polarität, Löslichkeit. Beispiele für Aminosäurenpaare mit ähnlichen
25 Eigenschaften sind Glu und Asp, Val und Ile, Ser und Thr.

Unter einer Deletion versteht man erfindungsgemäß das Entfernen wenigstens eines Nukleotids oder wenigstens eines Aminosäurerests. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die DNA-Regionen, die für die Termini des Polypeptids und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen kodieren. Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß DNA-Sequenzen, die für ADSS-Proteine kodieren, die durch N-terminale Verkürzungen um bis zu etwa 100, wie z.B. um 20 bis 100 Aminosäuren, aus der in Figur 3 (SEQ ID
35 NO:2) dargestellten Sequenz entstehen.

Insertionen umfassen erfindungsgemäß Einfügungen von wenigstens einem Nukleotid oder Aminosäurerest in eine der erfindungsgemäßen Sequenzen.

Als weitere erfindungsgemäße funktionell äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein nicht-pflanzliches ADSS-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit gleicher oder verschiedener enzymatischer Aktivität sein. Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das ADSS an den gewünschten Wirkort leitet.

10

Gegenstand der Erfindung sind somit auch Expressionskassetten, deren kodierende Sequenz für ein ADSS-Fusionsprotein kodiert, wobei Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation der ADSS-Sequenz steuert. Besonders bevorzugt sind Chloroplasten-spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der ADSS-Sequenz in die Pflanzenchloroplasten (Hauptort der Purinbiosynthese in Pflanzen) vom ADSS-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid abgeleitet von plastidärer Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids. Besonders bevorzugt ist eine Expressionskassette, welche eine der in Figur 5 (SEQ ID NOs:3,4,5) dargestellte Transitpeptid-DNA-Sequenz enthält.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten umfassen außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende, der kodierenden Sequenz einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal, und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für ADSS und/oder Transitpeptid operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung der genannten regulativen Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz erfüllen kann.

Als Promotor der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremddgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor. Insbesondere bevorzugt ist der 35S CaMV-Promotor aus dem Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. (1980) Cell 21, 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer konstitutiven Expression des

eingeführten Gens führen (Benfey et al. (1989) EMBO J. 8, 2195-2202).

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignalen aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere dem Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen.

- 10 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten ADSS-DNA und vorzugsweise einer zwischen Promotor und ADSS-DNA insertierten für ein Chloroplasten-spezifisches Transitpeptid kodierenden DNA sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen
- 15 Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- Die zur Herstellung erfindungsgemäßer Expressionskassetten erforderliche ADSS-DNA oder -cDNA wird vorzugsweise mit Hilfe der
- 25 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Verfahren zur DNA-Amplifikation mittels PCR sind bekannt, beispielsweise aus Innis et al., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990). Zweckmäßigerweise können die PCR-erzeugten
- 30 DNA-Fragmente durch Sequenzanalyse zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten überprüft werden.

- Gegenstand der Erfindung ist auch ein Expressions-Kit, das mindestens drei Expressionskassetten umfaßt, wobei mindestens zwei
- 35 eine variable Region oder Frame-Shift-Sequenz enthalten, die sich durch Insertion oder Deletion, vorzugsweise Insertion, einer nicht durch 3 teilbaren Zahl von Nukleotiden voneinander unterscheiden und somit eine Verschiebung des Leserahmens für eine stromabwärts insertierte Sequenz um ein bzw. zwei Nukleotide bewirken. Das 5'-Ende der Frame-Shift-Sequenz ist mit der Transitpeptidsequenz verknüpft. Die Frame-Shift-Sequenz umfaßt am
- 40 3'-Ende eine Restriktionsschnittstelle, in welche z.B. die ADSS-DNA-Sequenz insertiert wird. Durch Bereitstellung von mindestens drei Vektoren, die je eine Expressionskassette des Kits mit
- 45 unterschiedlichen Leserahmen für das insertierte Gen enthalten, ist gewährleistet, daß die Fusionskonstrukte aus einer beliebigen DNA-Sequenz und einer für ein Transitpeptid kodierenden DNA-Se-

quenz in drei verschiedenen Leserastern exprimiert werden können, wobei wenigstens eines der Konstrukte zur Expression von funktionellem Genprodukt (wie z.B. ADSS) führt. Die Konstruktionsschemata für einen drei Expressionskassetten enthaltenden erfindungs-
5 gemäßen Expressions-Kits der zur Transformation von Pflanzen besonders geeignet ist, werden in beiliegender Figur 6 gezeigt.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung solcher Kits zur Transformation eines pflanzlichen Wirts.

10

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Be-
15 sonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können, wie z.B. pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711).

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher rekombinante Vektoren, wie z.B. Plasmide oder Viren, enthaltend wenigstens eine erfindungsgemäße Expressionskassette. Ein besonders bevorzugtes rekombinantes Plasmid mit der Bezeichnung pTP09-ASS enthält das in Figur 7 abgebildete Gen-Konstrukt und verleiht dem
25 damit transformierten pflanzlichen Wirt Resistenz gegen pflanzliche ADSS-Inhibitoren, wie z.B. Hydantocidin.

Zur Transfektion einer Wirtspflanze mit einer ADSS-DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insert in einen rekombi-
30 nanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

35

Die erfindungsgemäßen Vektoren können zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen verwendet werden.

Die erfindungsgemäß fusionierten DNA-Konstrukte können auch durch
40 verschiedene andere bekannte Verfahren in pflanzliche Genome transferiert werden. Geeignete Verfahren sind beispielsweise Protoplasten-Transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Elektroporation, Beschallung oder Mikroinjektion sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder
45 Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeelektroporation, Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, biolistischer Gentransfer und besonders bevorzugt Agrobacterium-Transfor-

mation. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) 5 *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42, 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das fusionierte Konstrukt in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium* 10 *tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die 15 Transformation von Pflanzen durch *Agrobakterien* ist unter anderem bekannt aus F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 20 S. 15-38 und aus S.B. Gelvin, *Molecular Genetics of T-DNA Transfer from Agrobacterium to Plants*, gleichfalls in *Transgenic Plants*, S. 49-78. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die in die erfindungsgemäße Expressionskassette integrierte ADSS-DNA exprimieren. 25

Die Wirksamkeit der transgen exprimierten ADSS kann beispielsweise *in vitro* durch einen Enzymassay getestet werden, wie in Baugher et al., *Biochem. Res. Commun.*, 94:123-129 (1980); Stayton 30 et al., *Curr. Top. Cell. Regul.*, 22:103-141 (1983); und Bass et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 256:335-342 (1987) beschrieben.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder Pilze, welche einen erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor enthalten. 35

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder Mikroorganismus, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher 40 Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.

45 Die transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile können mit einem Wirkstoff, der die pflanzliche ADSS inhibiert, behandelt werden, wodurch die nicht erfolgreich transformierten

Pflanzen, -zellen, -gewebe oder Pflanzenteile absterben. Beispiele für geeignete Wirkstoffe sind Alanosin, Hadacidin und insbesondere Hydantocidin sowie Metabolite und funktionelle Derivate dieser Verbindungen. Die in die erfindungsgemäßen Expressionskas-

5 setten insertierte ADSS-DNA kann somit als Selektionsmarker verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft somit die Verwendung von Vektoren oder damit transformierten Mikroorganismen zur

10 Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen insbesondere zur Expression exogener Proteine, Glycoproteine oder Fusionsproteine. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Vermittlung von Resistenz gegen Inhibitoren pflanzlicher ADSS.

15 Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte, insbesondere die Fusionsproteine aus Transitpeptid und Proteinteil mit nicht-pflanzlicher ADSS-Aktivität.

20 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel 1: PCR-Amplifikation der Escherichia coli Adenylosuccinat Synthetase mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide

25

Die PCR-Amplifikation der Escherichia coli ADSS wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (SEQ ID NO:6,7) sind in Figur 4 dargestellt und wurden der publizierten Sequenz entnommen. Die Reaktionsgemische enthielten 8ng/ μ l genomische DNA aus Escherichia coli, 0,5 μ M der entsprechenden Oligonukleotide, 200 μ M Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM

30

35 $MgCl_2$) und 0,02 U/ μ l Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur: 45°C, 1 min
Denaturierungstemperatur: 92°C, 1 min
40 Elongationstemperatur: 72°C, 1,5 min
Anzahl der Zyklen: 40

Es resultierte ein Fragment von 1300 Basenpaaren, das in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert wurde. Mit dem Ligationsansatz wurde

45 E. coli XL-I Blue transformiert und das Plasmid pGEM-ASS erhalten.

Beispiel 2: Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

In das Plasmid pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711) (kommerziell erhältlich von der Firma Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. (1980) Cell 21, 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., (1984) EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939, abgeleitet vom Octopin Synthase (OCS)-Gen, wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII-Schnittstellen des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66, 221-230).

Die cDNA-Sequenz des Transitpeptides (TP) der Transketolase (TK) wurde dem Plasmid pBluescript TK-26 (DE-A-19501906) entnommen und mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide als KpnI-BamHI-Fragment über eine Polymerase-Kettenreaktion in das Plasmid pBinAR inseriert. Durch Variation des verwendeten 3'-spezifischen Oligonukleotides wurden drei Vektoren als pflanzliche Expressionskassetten erhalten (pTP09, pTP10, pTP11, siehe Figuren 5 und 6), die es erlauben, chimäre Genkonstrukte mit der cDNA-Transitsequenz der plastidären Transketolase in drei verschiedenen Leserastern zu erzeugen.

Beispiel 3: Erstellung einer pflanzlichen Expressionskassette für die Adenylosuccinat Synthetase

Das DNA-Fragment kodierend für die Adenylosuccinat Synthetase wurde als BamHI-Fragment in den Vektor pTP09 kloniert. Es resultierte das Plasmid pTP09-ASS (siehe Figur 7). Durch Fusion des Transitpeptides (TP/TK) mit der Adenylosuccinat Synthetase wurde der Import des Proteins in den Chloroplasten gewährleistet.

Beispiel 4: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Pharmacia nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase-Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 5: Herstellung transgener Tabakpflanzen, die eine mikrobielle Adenylosuccinat Synthetase im Chloroplasten enthalten

- 5 Das Plasmid pTP09-ASS wurde in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 transformiert. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB-Medium (Vervliet et al., J. Gen. Virol. (1975) 26, 33). Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium ((1962) Physiol. Plant. 15, 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steri-
- 15 ler Pflanzen (zu je ca. 1 cm² wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5 bis 10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylelessigsäure und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.
- 25 Bei einer zweiten Transformation wurde entsprechend vorgegangen, jedoch wurde als Antibiotikum 220 mg/l Hydantocidin zugegeben.

Beispiel 6: Analyse vom Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

- 30 Zur genaueren Untersuchung der Expression wurde die Gesamt-RNA von Tabakpflanzen, wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschrieben, isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel auf-
- 35 trennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA-Moleküle wurde die RNA mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde, wie bei Amasino (Anal. Biochem. (1986) 152, 304) beschrieben, durchgeführt. Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem
- 40 Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert.

Beispiel 7: Enzymassay von aus transgenen Tabakpflanzen isolierter Adenylosuccinat Synthetase

Der Testansatz beinhaltete 14 mM Tris-HCl pH 8,3; 6 mM $MgCl_2$; 5 0,4 mM IMP; 0,1 mM GTP; 0,5 mM Phosphoenolpyruvat; 0,1 mM ATP; 2 U/ml Pyruvatkinase; 3 mM Aspartat sowie in einem 1 ml Testansatz 10 bis 100 μ l Enzympräparat. Es erfolgte eine Inkubation von 5 bis 20 min bei 25°C in Anwesenheit oder Abwesenheit des Inhibitors Hydantocidin und anschließende Messung bei 280 nm (Absorption von Adenylosuccinat) am Zweistrahlphotometer gegen einen Ansatz ohne Aspartat als Leerwert. Die rekombinante ADSS zeigte keine Inhibierung durch Hydantocidin.

Beispiel 8: Testung Hydantocidin-resistenter Tabakpflanzen

15 Mit dem Plasmid pTP09-ASS transformierte Tabakpflanzen wurden in Gewebekultur auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto Agar, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin angezogen und axiale Sprosse auf entsprechendes Medium mit 220 mg/l Hydantocidin überführt. Nichttrans-20 formierte Pflanzen starben innerhalb weniger Wochen ab, während resistente Pflanzen weiterwuchsen.

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: --
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

10

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Adenylosuccinat Synthetase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

15

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1311 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

25

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli

30

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1..6
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "BamHI Schnittstelle"

(ix) MERKMAL:

35

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 7..1302
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Adenylosuccinate Synthetase"

(ix) MERKMAL:

40

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1303..1305
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Stop codon"

(ix) MERKMAL:

45

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1306..1311
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "BamHI Schnittstelle"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

	GGATCC	ATG	GGT	AAC	AAC	GTC	GTC	GTA	CTG	GGC	ACC	CAA	TGG	GGT	GAC	48	
	Met	Gly	Asn	Asn	Val	Val	Val	Leu	Gly	Thr	Gln	Trp	Gly	Asp			
5		1				5				10							
	GAA	GGT	AAA	GGT	AAG	ATC	GTC	GAT	CTT	CTG	ACT	GAA	CGG	GCT	AAA	TAT	96
	Glu	Gly	Lys	Gly	Lys	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Lys	Tyr	
	15					20				25					30		
	GTT	GTA	CGC	TAC	CAG	GGC	GGT	CAC	AAC	GCA	GGC	CAT	ACT	CTC	GTA	ATC	144
10	Val	Val	Arg	Tyr	Gln	Gly	Gly	His	Asn	Ala	Gly	His	Thr	Leu	Val	Ile	
					35					40					45		
	AAC	GGT	GAA	AAA	ACC	GTT	CTC	CAT	CTT	ATT	CCA	TCA	GGT	ATT	CTC	CGC	192
	Asn	Gly	Glu	Lys	Thr	Val	Leu	His	Leu	Ile	Pro	Ser	Gly	Ile	Leu	Arg	
				50					55					60			
15	GAG	AAT	GTA	ACC	AGC	ATC	ATC	GGT	AAC	GGT	GTT	GTG	CTG	TCT	CCG	GCC	240
	Glu	Asn	Val	Thr	Ser	Ile	Ile	Gly	Asn	Gly	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ala	
			65					70					75				
	GCG	CTG	ATG	AAA	GAG	ATG	AAA	GAA	CTG	GAA	GAC	CGT	GGC	ATC	CCC	GTT	288
	Ala	Leu	Met	Lys	Glu	Met	Lys	Glu	Leu	Glu	Asp	Arg	Gly	Ile	Pro	Val	
		80					85					90					
20	CGT	GAG	CGT	CTG	CTG	CTG	TCT	GAA	GCA	TGT	CCG	CTG	ATC	CTT	GAT	TAT	336
	Arg	Glu	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	Glu	Ala	Cys	Pro	Leu	Ile	Leu	Asp	Tyr	
	95					100					105				110		
	CAC	GTT	GCG	CTG	GAT	AAC	GCG	CGT	GAG	AAA	GCG	CGT	GGC	GCG	AAA	GCG	384
	His	Val	Ala	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Glu	Lys	Ala	Arg	Gly	Ala	Lys	Ala	
				115					120					125			
25	ATC	GGC	ACC	ACC	GGT	CGT	GGT	ATC	GGG	CCT	GCT	TAT	GAA	GAT	AAA	GTA	432
	Ile	Gly	Thr	Thr	Gly	Arg	Gly	Ile	Gly	Pro	Ala	Tyr	Glu	Asp	Lys	Val	
				130					135					140			
	GCA	CGT	CGC	GGT	CTG	CGT	GTT	GGC	GAC	CTT	TTC	GAC	AAA	GAA	ACC	TTC	480
	Ala	Arg	Arg	Gly	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Leu	Phe	Asp	Lys	Glu	Thr	Phe	
			145					150					155				
30	GCT	GAA	AAA	CTG	AAA	GAA	GTG	ATG	GAA	TAT	CAC	AAC	TTC	CAG	TTG	GTT	528
	Ala	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Val	Met	Glu	Tyr	His	Asn	Phe	Gln	Leu	Val	
		160					165					170					
	AAC	TAC	TAC	AAA	GCT	GAA	GCG	GTT	GAT	TAC	CAG	AAA	GTT	CTG	GAT	GAT	576
35	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Glu	Ala	Val	Asp	Tyr	Gln	Lys	Val	Leu	Asp	Asp	
	175					180					185				190		
	ACG	ATG	GCT	GTT	GCC	GAC	ATC	CTG	ACT	TCT	ATG	GTG	GTT	GAC	GTT	TCT	624
	Thr	Met	Ala	Val	Ala	Asp	Ile	Leu	Thr	Ser	Met	Val	Val	Asp	Val	Ser	
				195						200				205			
	GAC	CTG	CTC	GAC	CAG	GCG	CGT	CAG	CGT	GGC	GAT	TTC	GTC	ATG	TTT	GAA	672
40	Asp	Leu	Leu	Asp	Gln	Ala	Arg	Gln	Arg	Gly	Asp	Phe	Val	Met	Phe	Glu	
				210					215					220			
	GGT	GCG	CAG	GGT	ACG	CTG	CTG	GAT	ATC	GAC	CAC	GGT	ACT	TAT	CCG	TAC	720
	Gly	Ala	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Asp	Ile	Asp	His	Gly	Thr	Tyr	Pro	Tyr	
			225					230					235				
45	GTA	ACT	TCT	TCC	AAC	ACC	ACT	GCT	GGT	GGC	GTG	GCG	ACC	GGT	TCC	GGC	768
	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Thr	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Gly	Ser	Gly	
		240					245					250					

	CTG GGC CCG CGT TAT GTT GAT TAC GTT CTG GGT ATC CTC AAA GCT TAC	816
	Leu Gly Pro Arg Tyr Val Asp Tyr Val Leu Gly Ile Leu Lys Ala Tyr	
	255 260 265 270	
5	TCC ACT CGT GTA GGT GCA GGT CCG TTC CCG ACC GAA CTG TTT GAT GAA	864
	Ser Thr Arg Val Gly Ala Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Phe Asp Glu	
	275 280 285	
	ACT GGC GAG TTC CTC TGC AAG CAG GGT AAC GAA TTC GGC GCA ACT ACG	912
	Thr Gly Glu Phe Leu Cys Lys Gln Gly Asn Glu Phe Gly Ala Thr Thr	
	290 295 300	
10	GGG CGT CGT CGT CGT ACC GGC TGG CTG GAC ACC GTT GCC GTT CGT CGT	960
	Gly Arg Arg Arg Arg Thr Gly Trp Leu Asp Thr Val Ala Val Arg Arg	
	305 310 315	
	GCG GTA CAG CTG AAC TCC CTG TCT GGC TTC TGC CTG ACT AAA CTG GAC	1008
	Ala Val Gln Leu Asn Ser Leu Ser Gly Phe Cys Leu Thr Lys Leu Asp	
15	320 325 330	
	GTT CTG GAT GGC CTG AAA GAG GTT AAA CTC TGC GTG GCT TAC CGT ATG	1056
	Val Leu Asp Gly Leu Lys Glu Val Lys Leu Cys Val Ala Tyr Arg Met	
	335 340 345 350	
	CCG GAT GGT CGC GAA GTG ACT ACC ACT CCG CTG GCA GCT GAC GAC TGG	1104
20	Pro Asp Gly Arg Glu Val Thr Thr Thr Pro Leu Ala Ala Asp Asp Trp	
	355 360 365	
	AAA GGT GTA GAG CCG ATT TAC GAA ACC ATG CCG GGC TGG TCT GAA TCC	1152
	Lys Gly Val Glu Pro Ile Tyr Glu Thr Met Pro Gly Trp Ser Glu Ser	
	370 375 380	
25	ACC TTC GGC GTG AAA GAT CGT AGC GGC CTG CCG CAG GCG GCG CTG AAC	1200
	Thr Phe Gly Val Lys Asp Arg Ser Gly Leu Pro Gln Ala Ala Leu Asn	
	385 390 395	
	TAT ATC AAG CGT ATT GAA GAG CTG ACT GGT GTG CCG ATC GAT ATC ATC	1248
	Tyr Ile Lys Arg Ile Glu Glu Leu Thr Gly Val Pro Ile Asp Ile Ile	
	400 405 410	
30	TCT ACC GAT CCG GAT CGT ACT GAA ACC ATG ATT CTG CGC GAC CCG TTC	1296
	Ser Thr Asp Pro Asp Arg Thr Glu Thr Met Ile Leu Arg Asp Pro Phe	
	415 420 425 430	
	GAC GCG TAAGGATCC	1311
	Asp Ala	

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 432 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Asn Asn Val Val Val Leu Gly Thr Gln Trp Gly Asp Glu Gly
 1 5 10 15

45

Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Thr Glu Arg Ala Lys Tyr Val Val
 20 25 30

Arg Tyr Gln Gly Gly His Asn Ala Gly His Thr Leu Val Ile Asn Gly
 35 40 45
 5 Glu Lys Thr Val Leu His Leu Ile Pro Ser Gly Ile Leu Arg Glu Asn
 50 55 60
 Val Thr Ser Ile Ile Gly Asn Gly Val Val Leu Ser Pro Ala Ala Leu
 65 70 75 80
 Met Lys Glu Met Lys Glu Leu Glu Asp Arg Gly Ile Pro Val Arg Glu
 85 90 95
 10 Arg Leu Leu Leu Ser Glu Ala Cys Pro Leu Ile Leu Asp Tyr His Val
 100 105 110
 Ala Leu Asp Asn Ala Arg Glu Lys Ala Arg Gly Ala Lys Ala Ile Gly
 115 120 125
 15 Thr Thr Gly Arg Gly Ile Gly Pro Ala Tyr Glu Asp Lys Val Ala Arg
 130 135 140
 Arg Gly Leu Arg Val Gly Asp Leu Phe Asp Lys Glu Thr Phe Ala Glu
 145 150 155 160
 Lys Leu Lys Glu Val Met Glu Tyr His Asn Phe Gln Leu Val Asn Tyr
 165 170 175
 20 Tyr Lys Ala Glu Ala Val Asp Tyr Gln Lys Val Leu Asp Asp Thr Met
 180 185 190
 Ala Val Ala Asp Ile Leu Thr Ser Met Val Val Asp Val Ser Asp Leu
 195 200 205
 25 Leu Asp Gln Ala Arg Gln Arg Gly Asp Phe Val Met Phe Glu Gly Ala
 210 215 220
 Gln Gly Thr Leu Leu Asp Ile Asp His Gly Thr Tyr Pro Tyr Val Thr
 225 230 235 240
 30 Ser Ser Asn Thr Thr Ala Gly Gly Val Ala Thr Gly Ser Gly Leu Gly
 245 250 255
 Pro Arg Tyr Val Asp Tyr Val Leu Gly Ile Leu Lys Ala Tyr Ser Thr
 260 265 270
 Arg Val Gly Ala Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Phe Asp Glu Thr Gly
 275 280 285
 35 Glu Phe Leu Cys Lys Gln Gly Asn Glu Phe Gly Ala Thr Thr Gly Arg
 290 295 300
 Arg Arg Arg Thr Gly Trp Leu Asp Thr Val Ala Val Arg Arg Ala Val
 305 310 315 320
 40 Gln Leu Asn Ser Leu Ser Gly Phe Cys Leu Thr Lys Leu Asp Val Leu
 325 330 335
 Asp Gly Leu Lys Glu Val Lys Leu Cys Val Ala Tyr Arg Met Pro Asp
 340 345 350
 45 Gly Arg Glu Val Thr Thr Thr Pro Leu Ala Ala Asp Asp Trp Lys Gly
 355 360 365

Val Glu Pro Ile Tyr Glu Thr Met Pro Gly Trp Ser Glu Ser Thr Phe
 370 375 380

5 Gly Val Lys Asp Arg Ser Gly Leu Pro Gln Ala Ala Leu Asn Tyr Ile
 385 390 395 400

Lys Arg Ile Glu Glu Leu Thr Gly Val Pro Ile Asp Ile Ile Ser Thr
 405 410 415

10 Asp Pro Asp Arg Thr Glu Thr Met Ile Leu Arg Asp Pro Phe Asp Ala
 420 425 430

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 258 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (I) ORGANELLE: Chloroplast
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 1..6
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "KpnI Schnittstelle"
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: transit_peptide
 (B) LAGE: 7..252
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 253..259
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "BamHI Schnittstelle"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

35 GGTACCATGG CGTCTTCTTC TTCTCTCACT CTCTCTCAAG CTATCCTCTC TCGTTCTGTC 60

CCTCGCCATG GCTCTGCCTC TTCTTCTCAA CTTTCCCCTT CTCTCTCAC TTTTCCGGC 120

CTTAAATCCA ATCCCAATAT CACCACCTCC CGCCGCCGTA CTCCTTCCTC CGCCGCCGCC 180

GCCGCCGTCG TAAGSTCACC GCGGATTCCT GCCTCAGCTG CAACCGAAAC CATAGAGAAA 240

40 ACTGAGACTG CGGGATCC 258

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 260 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- 5 (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(I) ORGANELLE: Chloroplast
- (ix) MERKMAL:
10 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1..6
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "KpnI Schnittstelle"
- (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: transit_peptide
(B) LAGE:7..252
- 15 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:253..254
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "frame shift insert"
- (ix) MERKMAL:
20 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:255..260
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "BamHI Schnittstelle"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
- | | |
|---|-----|
| GGTACCATGG CGTCTTCTTC TTCTCTCACT CTCTCTCAAG CTATCCTCTC TCGTTCTGTC | 60 |
| 25 CCTCGCCATG GCTCTGCCTC TTCTTCTCAA CTTTCCCCTT CTTCTCTCAC TTTTCCGGC | 120 |
| CTTAAATCCA ATCCCAATAT CACCACCTCC CGCCGCCGTA CTCCTTCTC CGCCGCCGCC | 180 |
| GCCGCCGTCG TAAGGTCACC GGCGATTCGT GCCTCAGCTG CAACCGAAAC CATAGAGAAA | 240 |
| 30 ACTGAGACTG CGCTGGATCC | 260 |
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 259 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
35 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- 40 (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(I) ORGANELLE: Chloroplast
- (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE:1..6
45 (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "KpnI Schnittstelle"

- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: transit_peptide
 (B) LAGE: 7..252
- 5 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 253
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Frame shift insert"
- 10 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 254..259
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "BamHI Schnittstelle"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
- | | |
|---|-----|
| GGTACCATGG CGTCTTCTTC TTCTCTCACT CTCTCTCAAG CTATCCTCTC TCGTTCTGTC | 60 |
| 15 CCTCGCCATG GCTCTGCCTC TTCTTCTCAA CTTTCCCCTT CTTCTCTCAC TTTTCCGGC | 120 |
| CTTAAATCCA ATCCCAATAT CACCACCTCC CGCCGCCGTA CTCCTTCCTC CGCCGCCGCC | 180 |
| GCCGCCGTCG TAAGGTCACC GCGATTCTGT GCCTCAGCTG CAACCGAAAC CATAGAGAAA | 240 |
| ACTGAGACTG CGGGGATCC | 259 |
- 20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
- 25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetic"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- 30
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:
- | | |
|--------------------------------------|----|
| AAGGATCCAT GGOTAACAAC GTCGTCGTAC TGG | 33 |
|--------------------------------------|----|
- 35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
- 40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetic"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- 45

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

23

5 AAOGATCCCG TACCAGAATT ACG

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle
5 regulativer Nukleinsäuresequenzen die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein Protein, welches einem pflanzlichen Wirt Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetase vermittelt.
- 10 2. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Inhibitor ausgewählt ist unter Alanosin, Hadacidin, Hydantocidin sowie Metaboliten und funktionell äquivalenten Derivaten davon.
- 15 3. Expressionskassette nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein Protein kodiert, das nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Synthetase oder ein funktionelles Äquivalent davon umfaßt.
- 20 4. Expressionskassette nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Synthetase von einer mikrobiellen Adenylosuccinat Synthetase abgeleitet ist.
- 25 5. Expressionskassette nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die mikrobielle Adenylosuccinat Synthetase aus *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces pombe* oder *Schizosaccharomyces pombe* abgeleitet ist.
- 30 6. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein Protein enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent davon kodiert oder eine Nukleinsäuresequenz von Rest + 7 bis + 1305 gemäß
35 SEQ ID NO:1 oder ein funktionelles Äquivalent davon umfaßt.
7. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nukleinsäuresequenz außerdem für ein Chloroplasten-spezifisches Transitpeptid kodiert.
40
8. Expressionskassette nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nukleinsäuresequenz für das Transitpeptid plastidärer Transketolase oder ein funktionelles Äquivalent
45 davon kodiert.

9. Rekombinanter Vektor, umfassend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
10. Vektor nach Anspruch 9, der im wesentlichen dem Vektor
5 pTP09-ASS entspricht.
11. Mikroorganismus, enthaltend einen rekombinanten Vektor nach Anspruch 9 oder 10.
- 10 12. Mikroorganismus nach Anspruch 11 aus der Gattung *Agrobacterium* und insbesondere der Art *Agrobacterium tumefaciens*.
13. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 9 und 10 oder eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 11 und 12
15 zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei den Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen Resistenz gegenüber Inhibitoren
20 pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetase vermittelt wird.
15. Verwendung einer kodierenden Nukleinsäuresequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 6 als Selektions- oder Markergen in Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder
25 -teilen.
16. Transgene Pflanze, transformiert mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 9 und 10 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, oder transgene Zellen, Gewebe,
30 Teile oder transgenes Vermehrungsgut davon.
17. Transgene Pflanze nach Anspruch 16, ausgewählt unter Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate,
35 Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.
18. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen nach einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß man
40 Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 9 und 10 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 11 und 12 transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert
45 und gegebenenfalls aus der Kultur Pflanzen regeneriert.

19. Expressionsprodukt einer in den Ansprüchen 1 bis 8 definierten Expressionskassette.
20. Expressionsprodukt nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet,
5 daß es im wesentlichen eine Aminosäuresequenz von Aminosäure + 1 bis + 432 gemäß SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent davon umfaßt.
21. Expressions-Kit für die Expression eines Fremdgens in einem
10 pflanzlichen Wirt, das mindestens drei Expressionskassetten umfaßt, wobei mindestens zwei Expressionskassetten davon unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen jeweils eine Frame-Shift-Sequenz enthalten, die sich von-
einander durch Insertion oder Deletion einer nicht durch 3
15 teilbaren Anzahl von Nukleotiden unterscheiden und den Leserahmen für eine stromabwärts liegende kodierende Nukleinsäuresequenz um ein bzw. zwei Nukleotide verschieben.
22. Expressions-Kit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß
20 jede Expressionskassette eine kodierende Sequenz für ein Chloroplasten-spezifisches Transitpeptid enthält und die gegebenenfalls enthaltene Frame-Shift-Sequenz auf deren 3'-Ende folgt.
23. Expressions-Kit nach Anspruch 22, enthaltend Expressions-
25 kassetten, die je eine der folgenden Nukleotidsequenzen:
SEQ ID NO:3 von Nukleinsäurerest +7 bis +252
SEQ ID NO:4 von Nukleinsäurerest +7 bis +254
SEQ ID NO:5 von Nukleinsäurerest +7 bis +253
30 oder ein funktionelles Äquivalent davon, enthalten.
24. Verwendung eines Expressions-Kits nach einem der Ansprüche 21 bis 23 zur Transformation eines pflanzlichen Wirts.

35

40

45

1/5

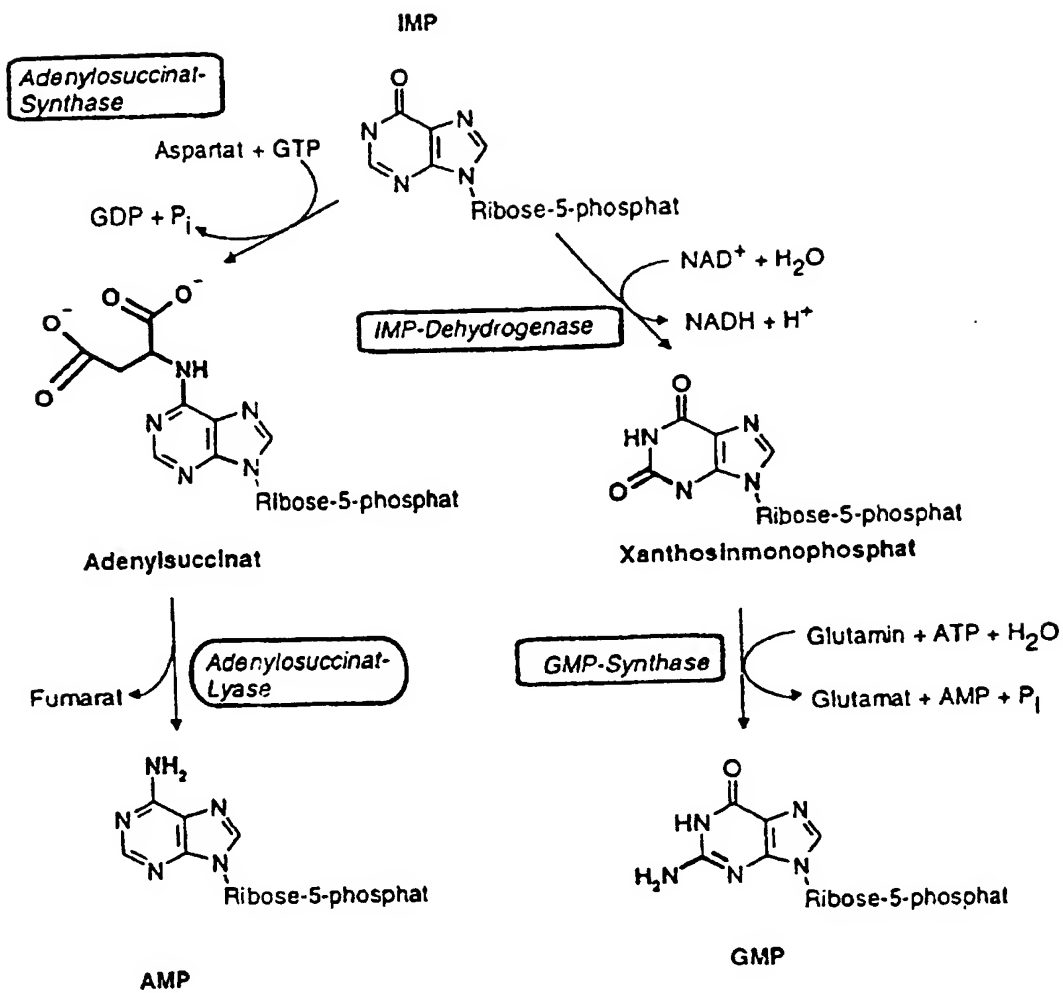


Fig. 1

BamHI-

ggatccATGGGTAACAACGTCGTCGTA CTGGGCACCCAAATGGGGTGACGAAGGTAAGGT
AAGATCGTCGATCTTCTGACTGAACGGGCTAAATATGTTGTACGCTACCAGGGCGGTCAC
AACGCAGGCCATACTCTCGTAATCAACGGTGAAAAAACCGTTCTCCATCTTATCCATCA
GGTATTCTCCGCGAGAATGTAACCAGCATCATCGGTAACGGTGTTGTGCTGCTCCGGCC
GCGCTGATGAAAGAGATGAAAGAACTGGAAGACCGTGGCATCCCCGTTCTGAGCGTCTG
CTGCTGCTGTAAGCATGTCCGCTGATCCTTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACGCGCGT
GAGAAAGCGCGTGCGCGGAAGCGATCGGCACCACCGGTCGTGGTATCGGGCCTGCTTAT
GAAGATAAAGTAGCACGTGCGGGTCTGCGTGTGGCGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTC
GCTGAAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACTTCCAGTGGTTAACTACTACAAA
GCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTCTGGATGATACGATGGCTGTTGCCGACATCCTG
ACTTCTATGGTGGTTGACGTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTCAGCGTGCGGATTTT
GTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTTATCCGTAC
GTAACCTCTTCCAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCTGGGCCCCGCT
TATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAGGTCCG
TTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTC
GGCGCAACTACGGGGCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCTGTCGT
GCGGTACAGCTGAACTCCCTGTTCTGGCTTCTGCCTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGC
CTGAAAGAGGTTAACTCTGCGTGGCTTACCGTATGCCGGATCGTCGCGAAGTGACTACC
ACTCCGCTGGCAGCTGACGACTGGAAGGTGTAGAGCCGATTTACGAAACCAATGCCGGGC
TGGTCTGAATCCACCTTCGGCGTGAAAGATCGTAGCGGCCTGCCGCAGGCGGCGCTGAAC
TATATCAAGCGTATTGAAGAGCTGACTGGTGTGCCGATCGATAATCATCTCTACCGATCCG
GATCGTACTGAAACCATGATTTCTGCGCGACCCGTTTCGACGCGTAaggatcc-BamHI

Fig. 2

3/5

MGNNVVVLGTQWGDEGKGKIVDLLTERAKYVVRYQGGHNAGHTLVINGEKTVLHLIPSGILR
ENVTSIIIGNGVVLSAALMKEMKELEDGIPVRERLLLSEACPLILDYHVALDNAREKARGA
KAIGTTGRGIGPAYEDKVARRGLRVGDLFDKETFAEKLKEVMEYHNFQLVNYKAEAVDYQK
VLDDTMAVADILTSMVVDVSDLLDQARQRGDFVMFEGAQGTLLDIDHGTYPYVTSSNTTAGG
VATGSGLGPRYVDYVLGILKAYSTRVGAGPFPTLFDLDETGEFLCKQGNEFGATTGRRRTGW
LDTVAVRRRAVQLNSLSGFCLTKLDVLDGLKEVKLCVAYRMPDGREVTTTTLAADDWKGVEPI
YETMPGWSESTFGVKDRSGLPQAALNYIKRIEELTGVPID!ISTDPDRRTETMILRDPFDA

Fig. 3

ASS E. coli Oligo 5': aaggatccatgggtaacaacgtcgtcggtactgg
ASS E. coli Oligo 3': aaggatcccgtaccagaattacg

Fig. 4

4/5

pTP09

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGC
CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCC
GCCGCCGTCTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGGATCC

BamHI

pTP10

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGC
CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCC
GCCGCCGTCTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGCTGGATCC

BamHI

pTP11

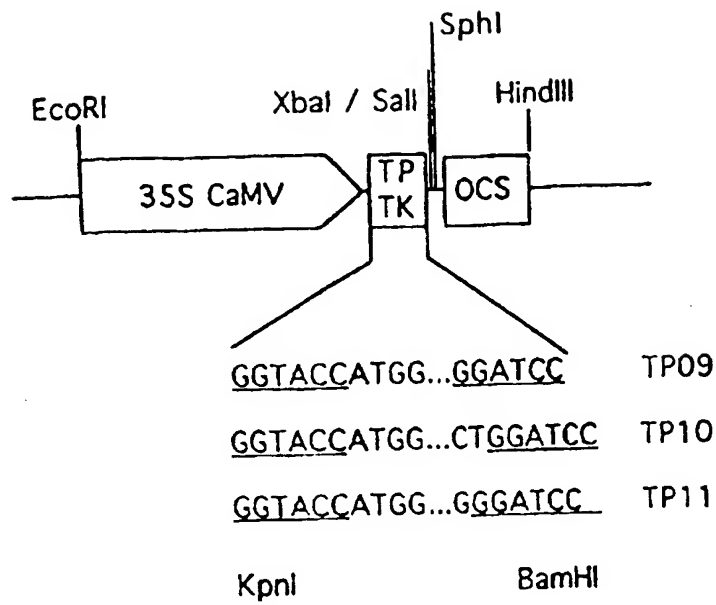
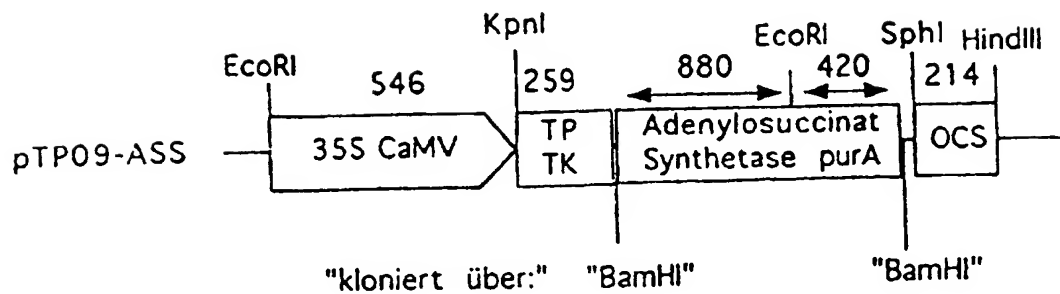
KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGC
CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCC
GCCGCCGTCTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGGGATCC

BamHI

Fig. 5

5/5

**Fig. 6****Fig. 7**



1/5

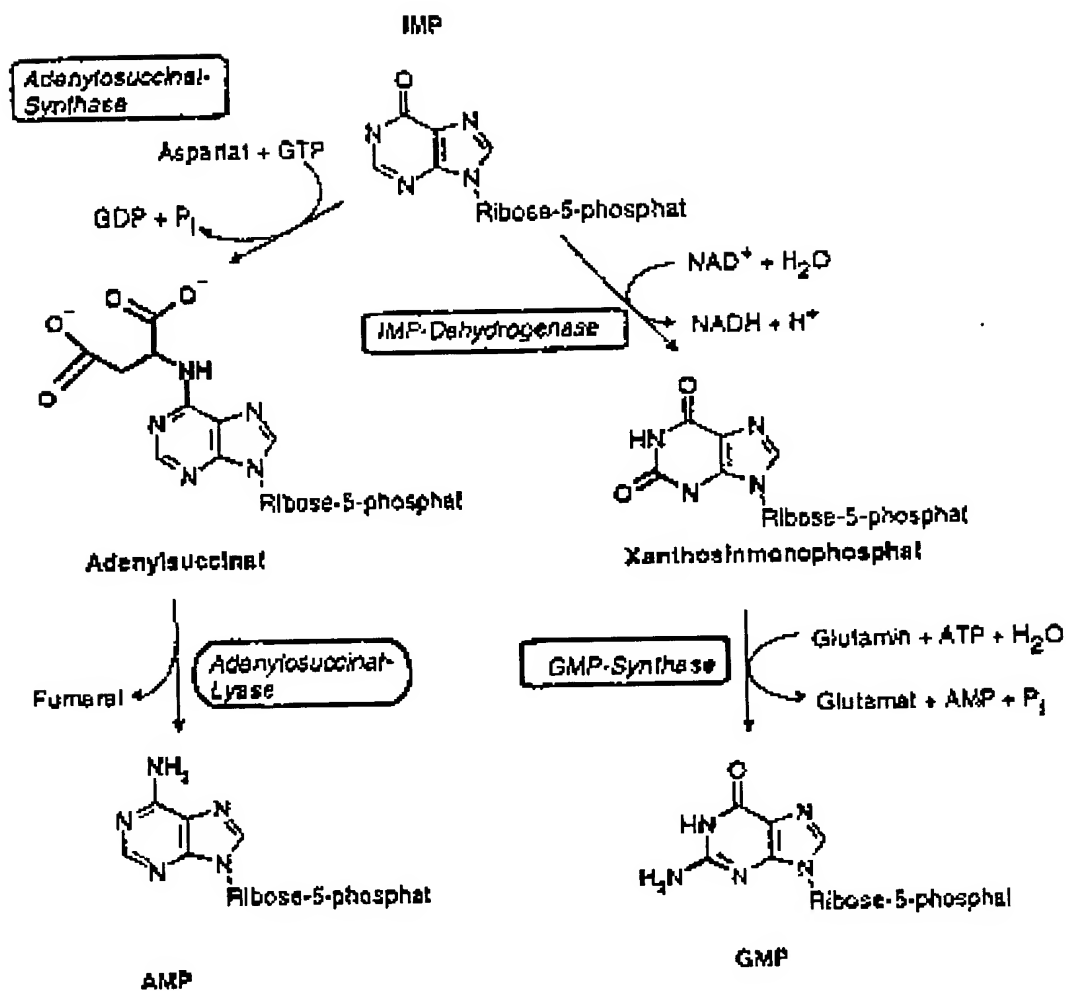


Fig. 1

2/5

BamHI-

ggatcccATGGGTAACAACGTCGTCGTA CTGGGCACCCAAATGGGGTGACGAAGGTAAAGGT
AAGATCGTCGATCTTCTEACTGAACGGGGCTAAATATGTTGTACGCTACCAGGGCGGTCA
AACCCAGGCCATACTCTCGTAATCAACGGTGAAAAAACCGTTCTCCATCTTATTCCATCA
GGTATTCTCCGCGAGAAATGTAACCGCATCATCGGTAACGGTGTTGTGCTGTC TCCGGCC
CCGCTGATGAAAGAGATGAAAGAACTGGAAGACCGTGGCATCCCCGTTGGTGAGCGTCTG
CTGCTGCTGTAAGCATGTCCGCTGATCCTTGATTATCACGTTGCCCTGGATAACGGCGGT
GAGAAAGCGCGTGGCCGGAAAGCGATCGGCACCACCGGTGGTGGTATCGGGCGCTGCTTAT
GAAGATAAAGTAGCACGTCCGCGGTCTGCGTGTTGCCGACCTTTTCGACAAAGAAACCTTC
GCTGAAAAACTGAAAGAAGTGATGGAATATCACAACTTCCAGTTCGGTTAACTACTACAA
GCTGAAGCGGTTGATTACCAGAAAGTCTGCGATGATACGATGGCTGTTGCCGACATCCTG
ACTTCTATGGTGGTTGACGTTTCTGACCTGCTCGACCAAGCGCGGTGAGCGTGGCGATTTC
GTCATGTTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCACGGTACTTATCCGTAC
GTAACCTCTTCCAAACACCACTGCTGGTGGCGTGGCGACCGGTTCCGGCCCTGGGCCCGGT
TATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAGGTCCG
TTCCCGACCGAACTGTTTGATGAATCTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTC
GGCGCAACTACGGGGCGTCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCTGTCGT
GCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTGGCTTCTGCCCTGACTAAACTGGACGTTCTGGATGGC
CTGAAAGAGGTAAACTCTGCGTGGCTTACCGTATGCCGGATCGTCGCGAAGTCACTACC
ACTCCGCTGGCAGCTGACGACTGGAAAGGTGTAGAGCCGATTACGAAACCATGCCGGGC
TGGTCTGAATCCACCTTCGGCGTGAAAGATCGTAGCGGCCCTGCCCGAGGCGGCGCTGAAC
TATATCAAGCGTATTGAAGAGCTGACTGGTGTGCCGATCGATATCATCTCTACCGATCCG
GATCGTACTGAACCATGATTCCTGCCCGACCCGTTCCGACGCGTAaggatcc-BamHI

Fig. 2

3/5

MGNNVVVLGTQWGDEGKGKIVDLLTERAKYVVRYQGCHNAGHTLVINGEKTVLHLIPSGILR
ENVTSIIIGNGVVLSPAALMKEMKELEDGIPVRERLLLSEACPLILDYHVALONAREKARGA
KAIGTTGRGIGPAYEDKVARRGRLRVGDLFDKETFAEKLKEVMEYHNFQLVNYYKAEAVDYQK
VLDDTMVAVADILTSMVVDVSDLLDQARQRQDFVMPEGAQGTLLDIDHGTYPYVTSSNTTAAQ
VATGSSGLCPRYVDYVLGILKAYSTRVGAGPFPTELFDGTGEP LCKQGNEFGATTGRRRRRTGW
LDTVAVRRRAVQLNSLSGFCLTKLDVLDGLKEVKLCVAYRMPDQREVTTTPLAADDWKGVFPI
YETMPGWSESTFGVKDRSGLPQAALNYIKRIEELTGVPIDIISTDPDRTE TMILRDPFDA

Fig. 3

ASS E. coli Oligo 5': aaggatccatgggttaacaacgtcgttgactgg
ASS E. coli Oligo 3': aaggatcccgtaccagaattacg

Fig. 4

4/5

pTP09

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCTCACTTTTTCGGC
CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCCGCTACTCCTTCTCCGCCGCCGC
GCCGCCGTCGTAAGGTCAACCGCGATTTCGTGCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGATCC

BamHI

pTP10

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCTCACTTTTTCGGC
CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCCGCTACTCCTTCTCCGCCGCCGC
GCCGCCGTCGTAAGGTCAACCGCGATTTCGTGCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGATCC

BamHI

pTP11

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCTCACTTTTTCGGC
CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCCGCTACTCCTTCTCCGCCGCCGC
GCCGCCGTCGTAAGGTCAACCGCGATTTCGTGCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGATCC

BamHI

Fig. 5

5/5

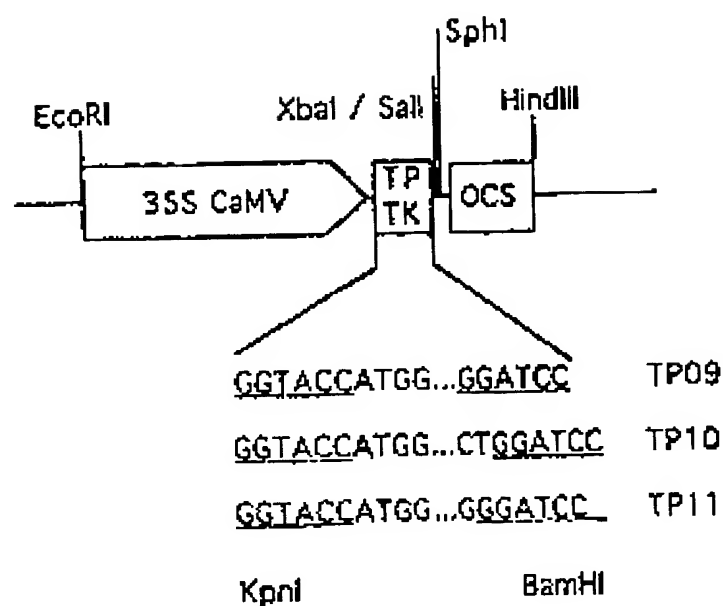


Fig. 6

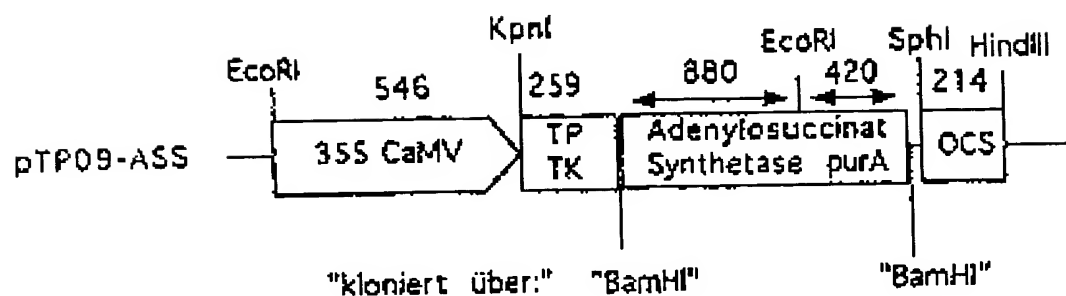


Fig. 7



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 9/00, 15/52, 15/82, 15/62, C12Q 1/68, A01H 5/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/10074 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. März 1998 (12.03.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04812 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. September 1997 (04.09.97) (30) Prioritätsdaten: 196 35 917.1 4. September 1996 (04.09.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK- TIENGESellschaft [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). SCHMIDT, Ralf- Michael [DE/DE]; Gräfensteinstrasse 14, D-67434 Neustadt (DE). SCHIFFER, Helmut [DE/DE]; Theodor-Heuss- Strasse 31, D-67112 Mutterstadt (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Martha-Brauttsch-Strasse 7a, D-06467 Hoym (DE). BADUR, Ralf [DE/DE]; Blechenstedter Strasse 7, D-31137 Hildesheim (DE). (74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitsstötter, Kinzebach & Partner, Postfach 86 06 49, D-81633 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 20. August 1998 (20.08.98)	
(54) Title: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE (54) Bezeichnung: ADENYLOSUCCINAT SYNTHETASE (57) Abstract <p>Expression cartridges are disclosed which confer to plants, plant cells, tissues or parts a resistance against inhibitors of the vegetable adenylosuccinate synthetases. Also disclosed is the use of the expression cartridges in appropriate vectors to transform plants, plant cells, tissues or parts.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Expressionskassetten, die in Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetasen vermitteln sowie die Verwendung der Expressionskassetten in geeigneten Vektoren zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 94/04812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/00 C12N15/52 C12N15/82 C12N15/62 C12Q1/68
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 512 260 A (AMERICAN CYANAMID CO) 11 November 1992 page 3 and page 11 ---	1,3-6
X	WOLFE S A ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND ANALYSIS OF THE PURA GENE ENCODING ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE OF ESCHERICHIA COLI K12" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 263, no. 35, 15 December 1988, pages 19147-19153, XP002054711 see the whole document ---	1,3-6
X	GB 2 197 653 A (JEFFERSON RICHARD ANTHONY) 25 May 1988 pages 6,7,36-38,; fig. 9 --- -/--	21,24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 1998

Date of mailing of the international search report

29.06.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/04812

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 19576 A (CIBA GEIGY AG) 27 June 1996 see page 7	1-20
A	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24 July 1996 cited in the application see page 3, line 10	1-24
A	FONNE-PFISTER R ET AL: "THE MODE OF ACTION AND THE STRUCTURE OF A HERBICIDE IN COMPLEX WITH ITS TARGET: BINDING OF ACTIVATED HYDANTOCIDIN TO THE FEEDBACK REGULATION SITE OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, no. 18, 3 September 1996, pages 9431-9436, XP002054712 see page 9436	1-20
A	SIEHL D L ET AL: "ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE: SITE OF ACTION OF HYDANTOCIDIN, A MICROBIAL PHYTOTOXIN" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 110, no. 3, March 1996, pages 753-758, XP002054713 see the whole document	1-20
A	WO 88 02402 A (CALGENE INC) 7 April 1988 see the whole document	21-24
A	GUERINEAU F ET AL: "AN EXPRESSION CASSETTE FOR TARGETING FOREIGN PROTEINS INTO CHLOROPLASTS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 16, no. 23, 9 December 1988, page 11380 XP000006780 see the whole document	21-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 97/04812**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Additional Matter

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found the present international application to comprise several (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1 - 20

The provision of expression cartridges comprising nucleotide sequences coding for non-plant adenylosuccinate synthetases (ADSS) and conferring resistance against inhibitors of plant ADSS enzymes; as well as the fusion of non-plant ADSS genes with the chloroplast-specific transit peptide of transketolase, use of the vector in producing herbicide-resistant, transgenic plants and use of the vector as selection and marker gene in transgenic plants.

2. Claims: 21 - 24

Expression kit for expressing foreign genes in plants, containing at least three cartridges which by inserting or deleting nucleotides shift the reading frame for the foreign gene located downstream by one or two nucleotides.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 04812

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0512260 A	11-11-1992	AU 654347 B	03-11-1994
		AU 1595992 A	05-11-1992
		CA 2067862 A	04-11-1992
		FI 921940 A	04-11-1992
		JP 5192161 A	03-08-1993

GB 2197653 A	25-05-1988	US 5432081 A	11-07-1995
		US 5599670 A	04-02-1997
		US 5268463 A	07-12-1993

WO 9619576 A	27-06-1996	US 5519125 A	21-05-1996
		US 5688939 A	18-11-1997
		AU 4342896 A	10-07-1996
		CA 2207024 A	27-06-1996
		EP 0813599 A	29-12-1997
		FI 972549 A	18-06-1997

EP 0723017 A	24-07-1996	DE 19501906 A	25-07-1996
		CA 2167768 A	24-07-1996

WO 8802402 A	07-04-1988	AU 620317 B	20-02-1992
		AU 8079787 A	21-04-1988
		EP 0285646 A	12-10-1988
		JP 1501038 T	13-04-1989

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04812

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N9/00 C12N15/52 C12N15/82 C12N15/62 C12Q1/68
A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 512 260 A (AMERICAN CYANAMID CO) 11.November 1992 Seite 3 und Seite 11 ---	1,3-6
X	WOLFE S A ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND ANALYSIS OF THE PURA GENE ENCODING ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE OF ESCHERICHIA COLI K12" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 263, Nr. 35, 15.Dezember 1988, Seiten 19147-19153, XP002054711 siehe das ganze Dokument ---	1,3-6
X	GB 2 197 653 A (JEFFERSON RICHARD ANTHONY) 25.Mai 1988 pages 6,7,36-38,; fig. 9 ---	21,24

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17.Juni 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29-06-1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

INTERNATIONALER PATENTFORSCHUNGSBERICHT

Inter in Patentzeichen
PCT/EP 97/04812

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 19576 A (CIBA GEIGY AG) 27.Juni 1996 siehe Seite 7 ---	1-20
A	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24.Juli 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 3, Zeile 10 ---	1-24
A	FONNE-PFISTER R ET AL: "THE MODE OF ACTION AND THE STRUCTURE OF A HERBICIDE IN COMPLEX WITH ITS TARGET: BINDING OF ACTIVATED HYDANTOCIDIN TO THE FEEDBACK REGULATION SITE OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 93, Nr. 18, 3.September 1996, Seiten 9431-9436, XP002054712 siehe Seite 9436 ---	1-20
A	SIEHL D L ET AL: "ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE: SITE OF ACTION OF HYDANTOCIDIN, A MICROBIAL PHYTOTOXIN" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 110, Nr. 3, März 1996, Seiten 753-758, XP002054713 siehe das ganze Dokument ---	1-20
A	WO 88 02402 A (CALGENE INC) 7.April 1988 siehe das ganze Dokument ---	21-24
A	GUERINEAU F ET AL: "AN EXPRESSION CASSETTE FOR TARGETING FOREIGN PROTEINS INTO CHLOROPLASTS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 16, Nr. 23, 9.Dezember 1988, Seite 11380 XP000006780 siehe das ganze Dokument -----	21-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/04812

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____

2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____

3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-20

Die Bereitstellung von Expressionskassetten, welche Nukleotidsequenzen umfassen, die für nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Synthetasen (ADSS) kodieren und welche Resistenz gegenüber Inhibitoren von pflanzlichen ADSS Enzymen vermitteln; weiterhin die Fusion von nicht-pflanzlichen ADSS Genen mit dem chloroplasten-spezifischen Transitpeptid der Transketolase und die Verwendung des Vektors zur Herstellung von herbizidresistenten transgenen Pflanzen und Verwendung des Vektors als Selektions- und Markergen in transgenen Pflanzen.

2. Ansprüche: 21-24

Expressions-kit zur Expression von Fremdgenen in Pflanzen, enthaltend mindestens drei Kassetten, welche durch Insertion oder Deletion von Nukleotiden das Leseraster für das stromabwärts gelegene Fremdgen um jeweils ein bzw. zwei Nukleotide verschieben.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04812

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0512260 A	11-11-1992	AU 654347 B	03-11-1994
		AU 1595992 A	05-11-1992
		CA 2067862 A	04-11-1992
		FI 921940 A	04-11-1992
		JP 5192161 A	03-08-1993

GB 2197653 A	25-05-1988	US 5432081 A	11-07-1995
		US 5599670 A	04-02-1997
		US 5268463 A	07-12-1993

WO 9619576 A	27-06-1996	US 5519125 A	21-05-1996
		US 5688939 A	18-11-1997
		AU 4342896 A	10-07-1996
		CA 2207024 A	27-06-1996
		EP 0813599 A	29-12-1997
		FI 972549 A	18-06-1997

EP 0723017 A	24-07-1996	DE 19501906 A	25-07-1996
		CA 2167768 A	24-07-1996

WO 8802402 A	07-04-1988	AU 620317 B	20-02-1992
		AU 8079787 A	21-04-1988
		EP 0285646 A	12-10-1988
		JP 1501038 T	13-04-1989

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)